

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03136220.6

C07K 14/165

C12N 15/50

C12N 15/63

C12P 21/00

A61K 38/16

A61P 31/14

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1223605C

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03136220.6

[71] 专利权人 中国科学院微生物研究所

地址 100080 北京市中关村北一条 13 号

共同专利权人 武汉大学

[72] 发明人 高福田 波 朱杰青 肖庚富

郑从义

审查员 陆纯

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 姜兆云

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称 抑制 SARS 冠状病毒的多肽药物及其衍生物和其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种利用多肽及其衍生物阻断 SARS 冠状病毒感染细胞的方法，其中多肽的氨基酸序列来自 SARS 冠状病毒 spike(S) 蛋白的两个七肽重复区 (heptad repeat, HR) HR1 和 HR2。本发明还提供了一种设计 HR1 和 HR2 多肽功能类似物的方法。本发明还提供了一种利用融合表达制备 SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR 多肽或其衍生物的方法。这种通过表达纯化或人工合成方法获得的 HR 多肽及其衍生物都对 SARS 病毒感染细胞有抑制活性，可开发成防治 SARS 疾病的多肽药物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

-
1. 一种阻断 SARS 冠状病毒感染细胞的多肽，其特征在于所述多肽是
5 来自 SARS 冠状病毒 spike 蛋白两个七肽重复区 HR1 或 HR2 的多肽，其中
所述 HR1 具有 Seq ID No: 1 所示的氨基酸序列，所述 HR2 具有 Seq ID No:2
所示的氨基酸序列。

抑制 SARS 冠状病毒的多肽药物及其衍生物和其应用

5

发明领域：

本发明属于病毒的分子生物学领域。具体的讲，涉及利用 SARS 冠状病毒 spike (S) 蛋白的七肽重复 (heptad repeat, HR) HR1 和 HR2 多肽及其衍生物进行对 SARS 冠状病毒感染的防治。

10

背景技术：

最近在全世界范围内爆发了一种传染性的重症急性呼吸综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 或称“非典型肺炎”，其病原目前已初步确定为一种新型冠状病毒 (Coronavirus)。冠状病毒是一种带囊膜的 RNA 病毒，同其它囊膜病毒相似，它需要通过病毒囊膜与细胞膜的融合将遗传物质释放到细胞内而完成对细胞的感染。对大多数囊膜病毒的融合机制研究发现，它们都是利用囊膜融合糖蛋白通过构象变化介导病毒囊膜和宿主细胞膜的融合，这些囊膜糖蛋白 (如流感病毒的 HA、HIV 的 gp120/gp41、埃博拉病毒的 Gp 以及呼吸道合胞病毒的 F 蛋白) 有着相似的结构特征，它们都有两段称为七肽重复 (heptad repeat, HR) 的区域—HR1 和 HR2，这两段区域在蛋白发挥融合活性时会形成一种稳定的六螺旋束或称发卡三聚体结构，这种结构对蛋白通过构象变化发挥融合功能至关重要，许多研究表明外源加入 HR1 或 HR2 多肽能够阻断蛋白本身的 HR1 和 HR2 间形成发卡三聚体，从而抑制了病毒囊膜和细胞膜的融合，最终阻止了病毒对细胞的感染。然而，至今还未见报道根据这种特性设计多肽或其类似物作为防治冠状病毒感染的药物。目前仅在艾滋病的治疗上已有报道进入三期临床试验的药物—T-20 (HR2 多肽衍生物)，就是这类药物的代表，其治疗作用效果很好。

发明内容:

在称为七肽重复 (Heptad Repeat, HR) 的研究上, 本研究小组已经在多种病毒中作了相关工作, 如人呼吸道合胞体病毒 (Wang, E., Sun, X., Qian, Y., Zhao, L., Tien, P. and Gao, G.F., *BBRC*. 2003, 5 302:469-475.), 麻疹病毒 (Zhu, J., Zhang, C.W-H., Qi, Y., Tien, P. and Gao, G.F., *BBRC*. 2002, 299:897-902.; Zhu, J., Ding, Y., Gao, F., Wu, T., Zhang, C.W-H., Tien, P., Rao, Z. and Gao, G.F. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr*. 2003, D59: 587-590.), 新出现的 Menangle 病毒 (Zhu, J., Zhang, C.W-H., Rao, Z. Tien, P. and Gao, 10 G.F. *Archives of Virology* 2003, in press) 等, 鸡新城疫病毒 (Yu, M., Wang, E., Liu, Y., Cao, D., Jin, N., Zhang, C.W-H., Bartlam, M., Rao, Z., Tien, P. and Gao, G.F. *Journal of General Virology* 2002, 83(Pt3):623-629; Zhu, J., Li, P., Wu, T., Zhang, C.W-H., Bartlam, M., Rao, Z., Gao, G.F and Tien, P. *Protein Engineering* 2003, in 15 press) 等。证实了它们的六螺旋束结构和病毒融合入侵的抑制试验。我们在这方面的技术平台已经建立。

参与冠状病毒融合的囊膜糖蛋白为 spike (S) 蛋白, 在 SARS 冠状病毒的全序列完成后 (加拿大), 本发明对其编码的蛋白质进行了系统分析, 发现 Spike 蛋白上也有两段特征性的七肽重复 (Heptad Repeat, HR1 和 20 HR2), 它在 S 蛋白中的位置请参看图 1, 图中还比较了艾滋病病毒这一区域在囊膜蛋白 (GP160) 中的位置, 这暗示 SARS 冠状病毒可能与 HIV 等有相似的融合机制。我们还进一步比较了所有在基因库 (GenBank) 中的 SARS 冠状病毒序列, 包括来自美国, 加拿大, 香港, 北京, 广东等的病毒基因组序列, 发现 HR1 和 HR2 这一区域是高度保守的, 因此, 用它们 25 作为药物靶点可以避免 SARS 冠状病毒变异引起的耐药性。为此, 本发明的目的在于提供了一种利用 HR1 和 HR2 多肽及其衍生物阻断 SARS 冠状病毒感染细胞的方法, 其中多肽的氨基酸序列来自 SARS 冠状病毒 spike (S) 蛋白的两个七肽重复区 (heptad repeat, HR) HR1 和 HR2, 本发明提供了 SARS 冠状病毒 spike 蛋白 HR1 和 HR2 区在蛋白上的位置及氨基酸 30 酸序列, 其中 HR1 具有如 Seq ID: No.1 所示的氨基酸序列; HR2 具有如

Seq ID: No.2 所示的氨基酸序列；应当指出的是，对上述序列进行一个或多个氨基酸的替换、插入和/或缺失所得到的功能类似物也能达到本发明的目的。本发明的另外一个目的还在于提供一种设计 HR1 和 HR2 多肽功能类似物的方法；本发明还提供了一种利用融合表达制备 SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR 多肽或其衍生物的方法。这种通过表达纯化或人工合成方法获得的 HR 多肽及其衍生物都对 SARS 病毒感染细胞有抑制活性，可开发成防治 SARS 疾病的多肽药物。

本发明提供了下列两种方法获得 HR 多肽或其衍生物：

10 1. 人工合成多肽

根据本发明提供的 SARS 冠状病毒 spike 蛋白的 HR1 和 HR2 序列，人工合成了对应于 HR1 和 HR2 的多肽，经 HPLC 鉴定，纯度大于 90%。

2. 基因工程方法

(1) 与 GST 融合表达制备 HR1 和 HR2 多肽或其衍生物

15 根据 SARS 病毒 S 蛋白 HR1 和 HR2 的氨基酸序列和大肠杆菌偏爱密码子，对 HR1 和 HR2 基因进行人工拼接，利用 BamH I /Xho I 酶切位点克隆到 GST 融合表达载体 pGEX-6p-1 中，经 DNA 序列测定确定所得基因序列是正确的。将 pGEX-6p-1/HR1 和 pGEX-6p-1/HR2 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，挑选单克隆接种含氨卞青霉素 (100 μ g/ml) 的适
20 量 2 \times YTA 液体培养基 (胰蛋白胨 16g, 酵母提取物 10g, 氯化钠 5g, 水 1000ml), 37 $^{\circ}$ C 摇振培养过夜作为种子液；将种子液按 1/100 接种量接种新鲜 2 \times YTA 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 摇振培养至 OD₅₉₀ 为 0.8-1.0 左右，加诱导物 IPTG 至终浓度 1mM, 37 $^{\circ}$ C 或 28 $^{\circ}$ C 继续培养 4h；5000rpm 离心 15min 收集菌体，加适量 PBS 缓冲液 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄,
25 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) 重悬菌体，超声波裂解菌体，超声波裂解后加入终浓度为 1% 的 TritonX-100, 冰浴 30min, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清；将超声波裂解上清通过经 PBS 平衡的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱，再用 PBS 洗涤亲和柱至少十个柱体积；用至少三个柱体积的还原型谷胱甘肽溶液 (10mM reduced glutathione, 50mM Tris-HCl pH

8.0) 洗脱, 收集洗脱液得到 GST-HR 蛋白, 用 Superdex G50 脱盐柱 (Pharmacia 公司) 或超滤浓缩再稀释的方法换成酶切缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.0; 150 mM NaCl; 1mM DTT; 1 mM EDTA, pH 8.0), 加入过量的 GST-3C 蛋白酶 5℃酶切 16h; 酶切产物再换成 PBS 缓冲液, 用
5 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱亲和除去酶切下的 GST 和 GST-3C, 收集穿透液得到 HR1 或 HR2 蛋白, 用截流分子量为 3K 的超滤管浓缩至适当浓度, 利用反向 HPLC 进一步纯化, -70℃冻存储备用。蛋白样品用 12%SDS-PAGE 或 Tris-tricine SDS-PAGE 鉴定。蛋白浓度用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Pierce 公司) 确定。

10 (2) 与人 GST 蛋白融合表达制备 HR1 和 HR2 多肽或其衍生物

将人 GST 蛋白基因与 SARS 冠状病毒 spike 蛋白 HR1 和 HR2 或其衍生物融合, 融合蛋白直接用于抑制 SARS 冠状病毒对细胞的感染。

本发明提供了设计 SARS 冠状病毒 spike 蛋白 HR1 和 HR2 多肽功能类似物的方法。由于 HR1 多肽的疏水性较强, 很易发生自身聚集, 稳定性
15 不好, 这就影响了其功能的发挥。本发明用氨基酸连接子将 HR1、HR2、HR1 串联起来 (称为 HR121) 进行表达和纯化, 同时将 HR1、HR2、HR1、HR2、HR1 五个多肽串联起来 (称为 5-Helix) 进行表达和纯化, 所得 HR121 和 5-Helix 稳定性高于单独的 HR1 多肽, 而功能与其相同。本发明还将 HR2、HR1、HR2 三个多肽串联起来 (称为 HR212) 进行表达和纯化, 所得 HR212
20 蛋白同样比单独的 HR2 多肽稳定且便于纯化, 而功能与其相似。

本发明提供了应用 SARS 冠状病毒 spike 蛋白 HR1 和 HR2 多肽或其衍生物阻断 SARS 病毒感染细胞的方法。将以上人工合成或基因工程方法获得的 HR 多肽或与 GST 或其他蛋白融合的 HR 蛋白倍比稀释与固定浓度的 SARS 冠状病毒混合, 而后共同吸附 Vero 等培养细胞, 观察 HR 多肽或 GST-HR
25 对 SARS 冠状病毒产生细胞病变 (CPE) 的影响, 结果表明 HR 多肽或 GST-HR 能够在 nM 浓度范围内抑制 CPE 的产生, 说明 HR 多肽能够阻断 SARS 冠状病毒对细胞的感染, 本发明所提供的 HR 多肽或其衍生物可以用于开发防治 SARS 病毒感染的药物。

30 附图简要说明:

图 1 SARS 冠状病毒 spike (S) 蛋白结构示意图。图示可能的 S1 和 S2 两个亚单位及跨膜区 (transmembrane domain) 和胞质区 (cytoplamic domain)。计算机程序预测的 HR1 和 HR2 在 S 蛋白的相应位置, 同时与 HIV-1 gp160 的 HR1 及 HR2 预测结果进行比较, 说明它们有相似的结构特征。

5 图 2 构建 HR1 和 HR2 多肽功能类似物示意图。5-Helix 为 HR1linker1HR2linker2HR1linker1HR2linker2HR1, HR121 为 HR1linker1HR2linker2HR1, HR212 为 HR2linker2HR1linker1HR2, 其中 linker1 的氨基酸序列为 SGGRGG (字母表示氨基酸的英文缩写), linker2 的氨基酸序列为 GGSGG (字母表示氨基酸的英文缩写)。5-Helix 和 HR121
10 与 HR1 多肽的功能类似, HR212 与 HR2 多肽的功能类似。

具体实施方式:

实施例

1. SARS 冠状病毒 spike (S) 蛋白 HR1 和 HR2 区的预测
15 所用 SARS 冠状病毒 S 蛋白序列来自 Toronto 分离株, 基因库收录号码为: NC_004718。利用计算机程序对 S 蛋白进行分析, 表明 SARS 冠状病毒 S 蛋白具有两个典型的七肽重复序列, 同时利用其它不同的程序进行分析, 结果 HR1 和 HR2 的位置相似, 最后确定 HR1 序列为 Seq ID: No. 1; HR2 序列为 Seq ID: No. 2。

20

2. SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR1 和 HR2 多肽的人工合成

根据实施例 1 所提供的 HR1 和 HR2 氨基酸序列, 人工合成了 HR2 多肽, 同时合成了三段不同长度的 HR1 多肽, 经 HPLC 鉴定纯度为 90%以上, 并且所合成的肽可溶性很好。

25

3. SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR1 基因的人工拼接

根据实施例 1 所提供的 HR1 序列和大肠杆菌偏爱密码子设计了下列十条引物用于拼接 HR1 基因:

S(hr1)1: 5' gat gga tcc gag aac cag aaa cag atc gcc aac cag ttc aac aag gcg atc 3'

S(hr1)2: 5' tga ggt cgt ggt aag tga ttc ttg aat ttg act gat cgc ctt gtt gaa ctg 3'
 S(hr1)3: 5' tca ctt acc acg acc tca act gca ttg ggc aag ctg cag gac gtt gtt aac 3'
 S(hr1)4: 5' ttt cac cag cgt gtt cag tgc ttg agc att ctg gtt aac aac gtc ctg cag 3'
 S(hr1)5: 5' ctg aac acg ctg gtg aaa caa ctt agc tct aat ttt ggt gcg att tca agt gtg 3'
 5 S(hr1)6: 5' gac ttt atc cag acg cga aag gat atc att cag cac act tga aat cgc acc 3'
 S(hr1)7: 5' tcg cgt ctg gat aaa gtc gag gcg gag gta caa atc gac cgt ctg atc acc 3'
 S(hr1)8: 5' tgt cac ata ggt ctg cag gct ttg aag acg gcc ggt gat cag acg gtc gat 3'
 S(hr1)9: 5' ctg cag acc tat gtg aca caa caa ctg atc cgt gct gct gaa atc cgt gct 3'
 S(hr1)10: 5' gac ctc gag tca agc aag att agc aga agc acg gat ttc agc agc 3'

10 其中每两条相邻引物都有 18 个碱基的互补序列，同时设计有 BamH I 和 Xho I 酶切位点以及终止密码。引物人工合成。按下列方法拼接 HR1 基因：第一步，混合 S(hr1)1-S(hr1)10 十条引物 (0.20D/ μ l)，按下列 PCR 条件进行扩增：94 $^{\circ}$ C 变性 5min，而后进行 94 $^{\circ}$ C 1.5 min, 55 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环；第二步，以 S(hr1)1 和 S(hr1)10 为引物，第
 15 一步 PCR 产物为模板，按同样的条件进行 PCR 扩增。无水乙醇沉淀法回收 PCR 产物，1%琼脂糖电泳鉴定。对所得基因用 BamH I 和 Xho I 双酶切，与同样经双酶切的 pGEX-6p-1 载体连接，通过酶切鉴定的方法筛选阳性克隆，最后经 DNA 序列测定证明所得 HR1 基因完全正确。

20 4. SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR2 基因的拼接

根据实施例 1 所提供的 HR2 序列和大肠杆菌偏爱密码子设计了下列四条引物用于拼接 HR2 基因：

S(hr2)1: 5' gac gga tcc ggc gac att tca ggc att aac gct tct gtc gtc aac att 3'
 S(hr2)2: 5' gac ctc att gag acg atc aat ttc ttt ttg aat gtt gac gac aga agc 3'
 25 S(hr2)3: 5' gat cgt ctc aat gag gtc gct aaa aat tta aac gaa tca ctg atc gac 3'
 S(hr2)4: 5' gta ctc gag tca gcc caa ttc ttg cag gtc gat cag tga ttc g 3'

其中每两条相邻引物都有 18 个碱基的互补序列，同时设计有 BamH I 和 Xho I 酶切位点以及终止密码。引物人工合成。按下列方法拼接 HR2 基

因：第一步，混合 S(hr2)1- S(hr2)4 四条引物 (0.20D/ μ l)，按下列 PCR 条件进行扩增：94 $^{\circ}$ C 变性 5min，而后进行 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环；第二步，以 S(hr2)1 和 S(hr2)4 为引物，第一步 PCR 产物为模板，按同样的条件进行 PCR 扩增。无水乙醇沉淀法回收 PCR 产物，1%琼脂糖电泳鉴定。对所得基因用 BamH I 和 Xho I 双酶切，与同样经双酶切的 pGEX-6p-1 载体连接，通过酶切鉴定的方法筛选阳性克隆，最后经 DNA 序列测定证明所得 HR2 基因完全正确。

5. SARS 冠状病毒 HR1 和 HR2 多肽的融合表达

10 将经 DNA 测序 pGEX-6p-1/HR1 和 pGEX-6p-1/HR2 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，挑选单克隆接种含氨卞青霉素 (100 μ g/ml) 的适量 2 \times YTA 液体培养基 (胰蛋白胨 16g, 酵母提取物 10g, 氯化钠 5g, 水 1000ml), 37 $^{\circ}$ C 摇振培养过夜作为种子液；将种子液按 1/100 接种量接种新鲜 2 \times YTA 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 摇振培养至 OD₅₉₀ 为 0.8-1.0 左右，加
15 诱导物 IPTG 至终浓度 1mM, 37 $^{\circ}$ C 或 28 $^{\circ}$ C 继续培养 4h; 5000rpm 离心 15min 收集菌体，加适量 PBS 缓冲液 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) 重悬菌体，超声波裂解菌体，超声波裂解后加入终浓度为 1%的 TritonX-100, 冰浴 30min, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清；将超声波裂解上清通过经 PBS 平衡的 Glutathione-Sepharose 4B
20 亲和层析柱，再用 PBS 洗涤亲和柱至少十个柱体积；用至少三个柱体积的还原型谷胱甘肽溶液 (10mM reduced glutathione, 50mM Tris-HCl pH 8.0) 洗脱，收集洗脱液得到 GST-HR 蛋白，经 12%SDS-PAGE 鉴定所得蛋白分子量与预期相符，其中 GST-HR1 为 38kDa 左右，GST-HR2 为 30kDa 左右；用 Superdex G50 脱盐柱 (Pharmacia 公司) 或超滤浓缩再稀释的方法将 GST-HR 换成酶切缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.0; 150 mM NaCl; 1mM DTT; 1 mM EDTA, pH 8.0), 加入过量的 GST-3C 蛋白酶 5 $^{\circ}$ C 酶切 16h; 酶切产物再换成 PBS 缓冲液，用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱亲和除去酶切下的 GST 和 GST-3C, 收集穿透液得到 HR1 或 HR2 蛋白，用截流分子量为 3K 的超滤管浓缩至适当浓度，利用反向 HPLC 进一步纯化，
25 70 $^{\circ}$ C 冻存备用。蛋白样品用 12%Tris-tricine SDS-PAGE 鉴定，结果所得
30

HR1 多肽为 12kDa 左右, HR2 多肽为 4kDa 左右, 与预期大小相符。蛋白浓度用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Pierce 公司) 确定。

6. SARS 冠状病毒 HR1 和 HR2 多肽与人 GST 的融合表达

- 5 将人 GST 与 HR1 或 HR2 多肽按与实施例 5 同样的方法融合表达和纯化, 得到的 GST-HR 蛋白直接用于检测其对抑制 SARS 冠状病毒感染细胞的活性。

7. SARS 冠状病毒 S 蛋白 HR1 和 HR2 多肽的体外结合

- 10 将按实施例 5 方法纯化的 GST-HR1 与表达纯化的 HR2 或人工合成的 HR2 多肽混合, 室温作用 1 小时, 再与适量 Glutathione-Sepharose 4B 亲和填料混合, 室温作用 30 分钟后用 PBS 缓冲液洗涤三次, 而后用还原型谷胱甘肽溶液洗脱, 最后进行 12%Tris-tricine SDS-PAGE 鉴定, 结果表明 GST-HR1 能够与表达纯化或人工合成的 HR2 多肽特异性结合, 说明 HR1 或
15 HR2 多肽及其衍生物是通过与病毒 S 蛋白上的相应 HR 区结合而发挥抑制活性。

8. 实施例 2、5 和 6 方法得到的 HR 多肽或其衍生物对 SARS 病毒感染培养细胞的抑制

- 20 Vero E6 细胞培养于 DMEM 培养基 (含 100U/ml 青链霉素, 10%胎牛血清) 中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养至生长成单层。将实施例 2、5 和 6 方法得到的 HR 多肽及其衍生物 (溶于 PBS 缓冲液中) 过滤除菌, 倍比稀释 (起始浓度为 100 μM) 后与固定浓度的 SARS 冠状病毒混 (病毒 TCID₅₀ 为 5) 合共同吸附上述细胞, 37°C 1 小时后, 吸弃病毒和肽的混合物, 加入
25 DMEM 维持液 (含 100U/ml 青链霉素, 2%胎牛血清), 37°C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养, 每个稀释度做 8 个重复, 每隔 12 小时观察细胞病变 (CPE) 情况。SARS 冠状病毒在 Vero 细胞上产生的 CPE 为细胞变圆、萎缩、折光性强, 最后细胞脱落。计算每个稀释度 CPE 被抑制的孔的数量, 进行统计分析, 最后计算 IC₅₀ 值。结果表明 HR2 多肽或 GST-HR2 都能抑制 SARS

冠状病毒在 Vero 细胞产生 CPE, IC_{50} 在 nM 范围内, 说明 HR2 多肽及其衍生物能够抑制 SARS 病毒感染细胞, 可用于开发防治 SARS 病毒的药物。

SARS Coronavirus S Protein

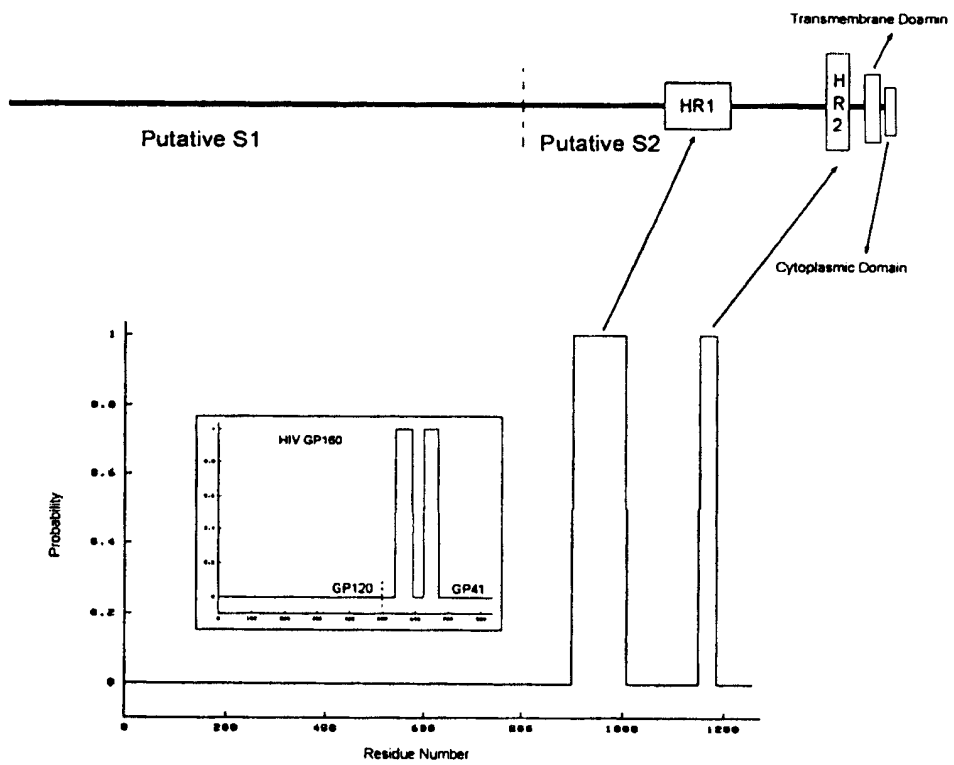


图 1

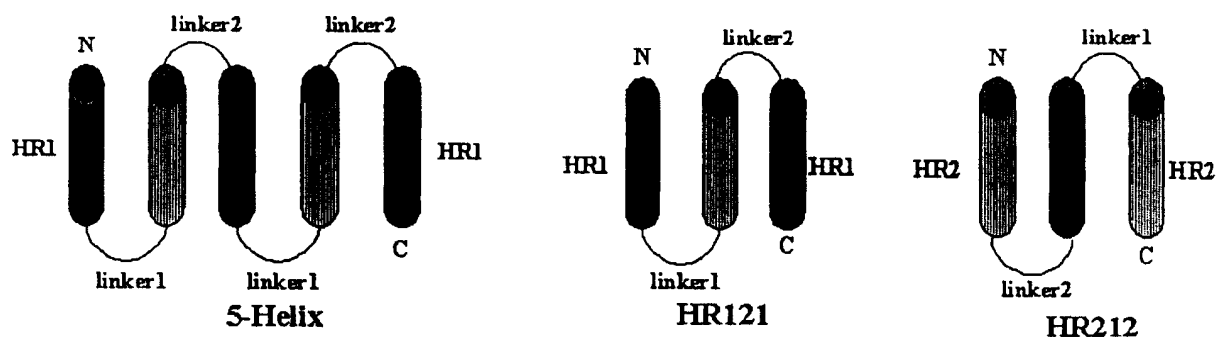


图 2